



**University of
Zurich**^{UZH}

**Zurich Open Repository and
Archive**

University of Zurich
University Library
Strickhofstrasse 39
CH-8057 Zurich
www.zora.uzh.ch

Year: 2014

Arzneimittel-Interaktionen auf der Ebene von Transportern des Hepatozyten

Stieger, Bruno ; Kullak-Ublick, Gerd A

Posted at the Zurich Open Repository and Archive, University of Zurich

ZORA URL: <https://doi.org/10.5167/uzh-98870>

Journal Article

Originally published at:

Stieger, Bruno; Kullak-Ublick, Gerd A (2014). Arzneimittel-Interaktionen auf der Ebene von Transportern des Hepatozyten. Pharmazeutische Medizin, 16(1):36-41.

Arzneimittel-Interaktionen auf der Ebene von Transportern

Bruno Stieger und Gerd A. Kullak-Ublick

Klinik für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, UniversitätsSpital Zürich, 8091 Zürich

Einleitung

Sehr viele Medikamente werden oral eingenommen. Solche Arzneimittel gelangen nach der Resorption im Intestinaltrakt über die Pfortader in die Leber. In den Sinusoiden der Leber können sowohl gelöste wie auch Protein-gebundene Arzneimittel mit dem Plasma durch die Fenestrae des Endothels in den Raum von Disse übertreten. Dort stehen das Plasma und die darin vorhandenen Arzneimittel im direkten Kontakt mit der basolateralen Plasmamembran der Hepatozyten. Die Hepatozyten der Leber sind hauptverantwortlich für die Metabolisierung von Arzneimitteln und auch für deren Exkretion. Diese erfolgt sowohl fäkal über die Galleflüssigkeit wie auch renal über den Urin.

Die Plasmamembran ist eine sehr effektive Barriere, welche den Durchtritt von Substanzen, sowohl für die Aufnahme in die Zelle wie auch für die Abgabe aus den Zellen verhindert. Die Barrierfunktion der Plasmamembran wird durch die Phospholipid-Doppelschicht wahrgenommen. Der Durchtritt von Substanzen durch die Plasmamembran wird selektiv durch Kanäle und Transportmoleküle in der Phospholipid Doppelschicht ermöglicht. Kanäle sind auf den Durchlass von Ionen wie zum Beispiel Natrium, Kalium oder Chlorid spezialisiert und zeichnen sich durch sehr hohe Flussraten aus. Transportproteine ermöglichen den Zellen die Aufnahme und Abgabe von vielen verschiedenen Substanzklassen wie zum Beispiel Aminosäuren, Zucker oder Zwischen- und Endprodukten des Stoffwechsels. Falls Substanzen unabhängig von Proteinen durch Plasmamembranen gelangen, spricht man von passiver Diffusion. Nachdem heute Transportsysteme für Bilirubin und Cholesterin, welche beide praktisch wasserunlöslich sind, bekannt sind, kann davon ausgegangen werden, dass in vivo die passive Diffusion praktisch bedeutungslos ist.

Die Hepatozyten sind morphologisch und funktionell polare Zellen, welche mit der dem Blutplasma zugewandten basolateralen und der den Kanalikuli zugewandten apikalen Membran umgeben sind. Beide Membranen enthalten spezifisch viele verschiedene Transportsysteme, welche sowohl in der Gallebildung und im Metabolismus, wie auch in der Ausscheidung der Arzneimittel eine zentrale Rolle spielen.

Das quantitativ wichtigste Transportsubstrat von Hepatozyten sind Gallensalze. Nach der Synthese der Gallensäuren und deren Konjugation an Glycin oder Taurin im Hepatozyten werden Gallensalze durch einen sogenannten ABC (ATP-binding cassette) Transporter, die Gallensäuren-Exportpumpe BSEP (*ABCB11*) über die kanalikuläre Membran in die primäre Galleflüssigkeit ausgeschieden. Mit der Galleflüssigkeit gelangen die Gallensalze über die Gallengänge und die Gallenblase in den Zwölffingerdarm, wo sie eine wichtige Rolle in der Fettverdauung und der Fettresorption spielen. Längs des Dünndarms werden die Gallensalze praktisch quantitativ in das Blut aufgenommen und gelangen über die Portalvene zurück zur Leber. Dort werden die Gallensalze über ein Natrium-abhängiges Transportsystem (*NTCP*, *SLC10A1*) und über Natrium-unabhängige Transportsysteme (OATPs, *SLCOs*) in die Hepatozyten aufgenommen, wo sie sich mit den neu synthetisierten Gallensalzen mischen. Die Sekretion aus den Hepatozyten durch BSEP in die primäre Galle startet diesen sogenannten enteroheptischen Kreislauf erneut. BSEP ist ausschliesslich in der kanalikulären

Membran, OATPs (OATP1B1, OATP1B3 und OATP2B1) und NTCP sind ausschliesslich in der basolateralen Membran von Hepatozyten exprimiert.

Bilirubin ist das Endprodukt des Abbaus der Hämgruppe. Es ist sehr schlecht wasserlöslich und im Plasma praktisch quantitativ an Albumin gebunden. In vitro Studien und pharmakogenetische Studien haben gezeigt, dass OATP1B1 und OATP1B3 die Aufnahme von Bilirubin in den Hepatozyten vermitteln können. Im Hepatozyten wird Bilirubin mit Glukuronsäure konjugiert und dadurch besser wasserlöslich. Das konjugierte Bilirubin wird durch den ABC-Transporter MRP2 (*ABCC2*) in den Kanalikulus exportiert.

In vitro Studien und Experimente mit genetisch veränderten Mäusen haben gezeigt, dass alle oben erwähnten Transportproteine Arzneimittel oder Arzneimittelmetaboliten transportieren können. So transportieren OATPs Antibiotikas, antidiabetische und antivirale Arzneimittel, Blutdruck-senkende Medikamente, Fibrate, Statine, Immunsuppressivas und Arzneimittel zur Krebstherapie. Weitere Transporter im Hepatozyten, welche Arzneimittel transportieren können, sind OAT2, OAT3, OCT1 und OCT3. OATs sind Transporter für anionische Verbindungen, während OCTs Kationen transportieren. Zusammengefasst ist die Palette der Transporter, welche in der basolateralen Membran der Hepatozyten exprimiert sind, in der Lage, die grosse Mehrheit der Arzneimittel aus dem Plasma zu extrahieren. Transporter spielen folglich eine entscheidende Rolle bei der Aufnahme von Arzneimitteln in Hepatozyten sowie deren anschliessende Metabolisierung und Elimination.

In den nachfolgenden Ausführungen werden wir uns in Bezug auf die Aufnahme von Arzneimitteln in Hepatozyten auf OATPs beschränken. Der genaue Transportmechanismus der OATPs ist noch nicht im Detail geklärt. In vitro Studien haben gezeigt, dass die meisten OATPs eine erhöhte Transportaktivität aufweisen, wenn der extrazelluläre pH tiefer als 7.4 ist. Das heisst, dass OATPs in einem sauren Mikroklima wie zum Beispiel im Dünndarm schnellere Transportraten aufweisen im Vergleich zum physiologischen pH, welcher üblicherweise bei in vitro Experimenten verwendet wird. Bis jetzt konnte gezeigt werden, dass bei vielen OATPs Bikarbonat als Gegenion dient während des Transportvorgangs. Zusätzlich konnten an Beispielen auch Glutathion sowie Glutathionkonjugate als Gegenionen demonstriert werden, wobei diese Anionen nicht für alle OATPs als Gegenionen extrapoliert werden können. Man kann davon ausgehen, dass die meisten, wenn nicht alle, OATPs mehr als eine Bindungsstelle für Substrate besitzen. Teilweise erkennen diese verschiedenen Bindungsstellen unterschiedliche Substrate, was bei der Planung von Experimenten berücksichtigt werden muss. Hemmstudien haben zusätzlich gezeigt, dass einzelne OATPs durch Inhibitoren in tiefer Konzentration zunächst in ihrer Aktivität stimuliert, bei hohen Konzentrationen der Inhibitoren dann aber gehemmt werden können. Im Moment ist es unklar, ob OATPs ihre Substrate wie zum Beispiel Arzneimittel auch gegen einen Konzentrationsgradienten in das Innere von Zellen transportieren können. Dieser Mangel an detaillierter Information über die molekularen Transportmechanismen bedingt, dass neue OATP-Substrate unter möglichst verschiedenen Bedingungen getestet werden sollten.

Arzneimittel-Interaktionen bei der Aufnahme in Hepatozyten

Arzneimittel-Interaktionen an Transportern, welche für die Aufnahme in Hepatozyten der betreffenden Arzneimittel wichtig sind, können verschiedene Konsequenzen haben. Falls zwei Arzneimittel über den gleichen OATP in Hepatozyten aufgenommen werden, kann eine klassische pharmakokinetische Interaktion vorausgesagt werden: C_{\max} und AUC_{0-24} werden bei Arzneimittel A unter gleichzeitiger Gabe von Arzneimittel B (und umgekehrt) deutlich erhöht. Dies hat zur Folge, dass die systemische Exposition ansteigt und somit auch das Risiko von Nebenwirkungen grösser werden kann. Ein sehr gut untersuchtes Beispiel dazu

sind die Statine, welche bei gleichzeitiger Gabe von Fibraten eine erhöhte Myotoxizität zeigen können. Andererseits kann eine solche Hemmung eine verminderte Aufnahme des Arzneimittels in die Zellen bewirken. Dies kann am Beispiel der Knollenblätterpilzvergiftung gezeigt werden: Die Toxine des Knollenblätterpilzes sind OATP-Substrate. Das zur Therapie verwendete Silibinin ist ein Hemmstoff der drei in den Hepatozyten exprimierten OATPs, welches die Aufnahme der Pilztoxine in die Hepatozyten reduziert. Substanzen, welche Transporter als Inhibitoren hemmen, sind nicht notwendigerweise auch Substrate des gehemmten Transportsystems. Dies muss im Einzelfall experimentell geprüft werden, wenn mit nicht-charakterisierten Substanzen gearbeitet wird. Konzeptionell ist auch die umgekehrte Situation möglich: Falls ein Arzneimittel ein funktioneller Aktivator von einem OATP ist, kann der Transport eines gleichzeitig verabreichten Arzneimittels durch den gleichen OATP beschleunigt werden. In dieser Situation würde man eine Abnahme von C_{\max} und AUC_{0-24} erwarten.

Es ist zu beachten, dass viele Medikamente, welche durch einen OATP in Hepatozyten aufgenommen werden können, anschliessend als Induktor von CYP3A4 (oder im Falle einer Phase I Metabolisierung) als Inhibitor des CYP3A4 wirken. So konnte zum Beispiel in einer Induktionsstudie mit Rifampicin gezeigt werden, dass am Tag 1 und 2 C_{\max} und AUC_{0-24} von Bosentan unter Rifampicin zunehmen, am Tag 7 hingegen stark abnehmen. Im ersten Fall wirkt Rifampicin als Inhibitor der OATPs und vermindert somit die Aufnahme von Bosentan in die Leberzellen. Im zweiten Fall ist durch Verabreichung von Rifampicin über 7 Tage CYP3A4 induziert, welches Bosentan metabolisiert. Dieses Ergebnis kann mechanistisch so interpretiert werden, dass durch die starke Aktivität des induzierten CYP3A4 die intrazelluläre Bosentan Konzentration niedrig bleibt. Dadurch wird der Konzentrationsgradient für Bosentan von aussen nach innen verkleinert und die Transportaktivität von OATP nimmt zu.

Zusammenfassend muss betont werden, dass im Einzelfall eine genaue Kenntnis des Metabolismus eines Arzneimittels unabdingbar ist, um in vivo zwischen einer Transporter-vermittelten und einer Metabolismus-vermittelten Arzneimittelinteraktion unterscheiden zu können.

Interaktionen mit der Sekretion von Gallensalzen am Kanalikulus

Gallensäuren und in einem geringeren Ausmass Gallensalze sind stark zytotoxisch. Aus diesem Grund ist es wichtig, dass die Pumpleistung von BSEP nicht beeinträchtigt wird. Es sind Patienten bekannt, welche eine vererbte Funktionsstörung von BSEP haben. Diese Patienten leiden unter einer intrahepatischen Cholestase und einer daraus resultierenden Lebererkrankung. Je nach Schweregrad der Funktionsstörung von BSEP müssen solche Patienten schon im Kindesalter durch Lebertransplantation therapiert werden, das sie im anderen Fall ein terminales Leberversagen entwickeln würden. Aus der Klinik ist gut bekannt, dass gewisse Arzneimittel bei anfälligen Patienten zu Arzneimittel-induzierten Cholestasen führen können. Mit in vitro Studien zu in Membranvesikeln überexprimiertem BSEP konnte gezeigt werden, dass Medikamente wie zum Beispiel Cyclosporin, Rifampicin, Bosentan oder Glibenclamid kompetitive Hemmer von BSEP sind. Vergleichende Studien haben gezeigt, dass die Hemmwirkung von Arzneimitteln auf BSEP des Menschen und der Ratte eine gute Korrelation aufweist. Da in praktisch allen Fällen die intrazellulären Arzneimittelkonzentrationen nicht bestimmt werden können, ist es schwierig, auf Grund einer kinetischen in vitro Charakterisierung der Hemmung von BSEP auf das Interaktionspotential in vivo extrapolieren zu können.

Bei Bosentan und bei Troglitazon konnte gezeigt werden, dass sowohl die Muttersubstanz wie auch deren Metaboliten Hemmstoffe von BSEP sein können. Dies kann zur Folge haben, dass

die Hemmwirkung eines Arzneimittels auf BSEP durch die entsprechenden Metaboliten verstärkt wird. Bei Troglitazon wurde zusätzlich gezeigt, dass durch die Biotransformation Metaboliten gebildet werden, welche die Mitochondrien schädigen. Durch die Hemmung von BSEP findet ein Anstieg der zytosolischen Konzentration von Gallensalzen statt, welche selbst auch toxisch auf die Mitochondrien wirken. Dies führt zusammen mit den Metaboliten von Troglitazon zu einem Synergismus in der Schädigung der Mitochondrien.

Oestrogene sind dafür bekannt, dass sie zu cholestatischen Leberschädigungen führen können. In vitro Studien haben gezeigt, dass der Metabolit Oestradiol-17 β -Glukuronid kein Hemmstoff von BSEP ist. Wird hingegen BSEP zusammen mit MRP2 exprimiert, kann eine Hemmung von BSEP beobachtet und somit die klinische Beobachtung der Cholestase mechanistisch erklärt werden. Da Oestradiol-17 β -Glukuronid ein sehr gutes Substrat für MRP2 ist, wurde postuliert dass dieser Metabolit zunächst in den Kanalikulus transportiert werden muss, bevor er als Hemmstoff von BSEP wirken kann.

Interaktionen mit der Elimination von Bilirubin

Da unkonjugiertes und konjugiertes Bilirubin Substrate von OATPs sind, können Arzneimittel die Aufnahme von Bilirubin in die Hepatozyten reduzieren. In diesem Fall wird in der Klinik eine Hyperbilirubinämie beobachtet. Dies ist aber klar von einer Hyperbilirubinämie zu unterscheiden, welche durch eine Schädigung von Hepatozyten (zum Beispiel durch Viren oder Medikamente) verursacht wird. So wurde zum Beispiel beobachtet, dass Patienten, welche intravenös mit hohen Dosen Silibinin behandelt wurden, häufig eine Hyperbilirubinämie entwickeln. Falls ein Arzneimittel die Konjugation von Bilirubin mit Glukuronsäure hemmt, ist ebenfalls eine Hyperbilirubinämie zu erwarten. Wie BSEP, können Arzneimittel auch MRP2 hemmen. Eine solche Hemmung führt zu einer reduzierten Ausscheidung von Bilirubinglukuroniden in die Galleflüssigkeit - mit nachfolgender Hyperbilirubinämie. Patienten mit Dubin-Johnson Syndrom haben kein funktionelles MRP2 in Hepatozyten. Bei diesen Patienten wird Bilirubin durch kompensatorische Transportsysteme, welche ebenfalls zur Superfamilie der ABC-Transporter gehören, über die basolaterale Membran zurück ins Blut und anschliessend renal ausgeschieden. Da das Dubin-Johnson Syndrom einen benignen Verlauf zeigt, ist die Hemmung von MRP2 durch Arzneimittel oder durch Arzneimittelmetabolite wohl nicht von grosser klinischer Bedeutung.

Bedeutung von Interaktionen auf Transporterebene für die Arzneimittelentwicklung

Durch neue Empfehlungen der amerikanischen (FDA) und europäischen (EMA) Arzneimittelbehörden zur Rolle von Transportsystemen bei Interaktionen und Nebenwirkungen hat die Bedeutung der in vitro Untersuchung von Transportproteinen während der Arzneimittelentwicklung stark zugenommen. Der Vorteil von Transportexperimenten während der Arzneimittelentwicklung liegt darin, dass Entscheidungsgrundlagen für klinische Studien gewonnen werden können. Dabei sind häufig Informationen und teilweise klinische Daten von Verbindungen aus der gleichen chemischen Klasse vorhanden, welche zur Entscheidungsfindung herangezogen werden können. Zusätzlich ist schon früh bekannt, welche Komedikationen für eine neue Verbindung in der Klinik zu erwarten sein werden. In vitro Transportexperimente an Zelllinien, welche hepatozelluläre OATPs exprimieren, werden mit hoher Wahrscheinlichkeit den Hinweis liefern, dass eine neue Verbindung zu kinetischen Interaktionen mit anderen bekannten OATP-Substraten führen wird. Falls die kinetischen Parameter der neuen Verbindung für die involvierten Transportsysteme bekannt sind, können Simulationsstudien mit vorhandenen pharmakokinetischen Modellen durchgeführt werden. Solche Simulationen sind wertvolle Planungsgrundlagen für zukünftige klinische pharmakokinetische Studien. Es ist davon auszugehen, dass solche Modellierungen in Zukunft auch für wichtige genetische Varianten

von Transportproteinen möglich sein werden. Diese Daten dürften es erlauben, früh abzuschätzen, ob geplante Dosierungsschemata bei Subpopulationen von Patienten zu Plasmakonzentrationen führen, welche ausserhalb des therapeutischen Fensters liegen. Es ist offensichtlich, dass dieser Ansatz nur dann Erfolg haben wird, wenn möglichst viele Informationen über die Biotransformation der neuen Verbindungen sowie über mögliche relevante Transportproteine für die Verteilung der neuen Substanzen zur Modellierung verwendet werden können.

Bezüglich der Interaktion mit Effluxtransportern, ist das Vorgehen weniger allgemein definiert und sollte wohl fallweise entschieden werden. Die Hauptschwierigkeit liegt hier darin, dass in der Regel keine präzisen Informationen über freie intrazelluläre Konzentrationen von Arzneimitteln und deren Metaboliten erhalten werden können. Wird also zum Beispiel eine Hemmung von BSEP durch eine neue Verbindung während der Entwicklung beobachtet, kann nicht mit genügender Sicherheit vorausgesagt werden, dass es tatsächlich zu cholestatischen Nebenwirkungen kommen wird. Die Information der in vitro BSEP Hemmung ist aber trotzdem sehr wertvoll, da sie in Bezug gesetzt werden kann zu Arzneimitteln aus der gleichen chemischen Klasse, welche allenfalls schon zugelassen sind. Darüber hinaus sind beobachtete BSEP Hemmungen bei niedriger Konzentration von neuen Substanzen als Hinweis für zukünftige klinische Studien zu betrachten. In solchen Fällen dürfte es angebracht sein, schon in den ersten Phasen der klinischen Entwicklung die Erhebung von cholestatischen Parametern (wie zum Beispiel eine Erhöhung von Serumgallensalzen und der alkalischen Phosphatase) vorzunehmen. Ebenfalls weisen solche in vitro Studien schon früh darauf hin, dass vorbestehende Einschränkungen der Leberfunktion allenfalls besondere Vorsicht beim klinischen Einsatz einer neuen Verbindung erfordern oder sogar eine Kontraindikation darstellen.

In vitro Transportuntersuchungen sind auch wertvolle Hilfsmittel, um in der Klinik beobachtete pharmakokinetische Interaktionen oder unerwünschte Arzneimittelwirkungen im Nachhinein mechanistisch abzuklären. So kann zum Beispiel abgeklärt werden, ob eine beobachtete Hyperbilirubinämie auf eine Hemmung von OATPs und/oder MRP2 zurückgeführt werden kann. In diesem Fall dürfte eine solche unerwünschte Arzneimittelwirkung als wesentlich weniger gravierend zu beurteilen sein als in Situationen, in welchen die Hyperbilirubinämie auf einen hepatozellulären Schaden ("Hy's law") zurückzuführen ist. Auf Grund der unterschiedlichen Angriffspunkte im Bilirubin-Metabolismus (Aufnahme, Konjugation oder Export) ist es sicher immer angebracht, neben dem totalen Serumbilirubin auch das direkte (konjugierte) Serumbilirubin zu bestimmen.

Werden in klinischen Studien cholestatische Nebenwirkungen beobachtet, so liefert eine nachfolgende Hemmstudie mit BSEP sicher wichtige Entscheidungsgrundlagen für das weitere Vorgehen in der klinischen Entwicklung.

Schlussfolgerung

Studien mit Transportsystemen während der Arzneimittelentwicklung werden heute von den Zulassungsbehörden vorgeschlagen oder fallweise eingefordert. Aus diesem Grunde sind Transportexperimente sicherlich ein wichtiges Werkzeug in der Arzneimittelentwicklung. Über den Zeitpunkt der Durchführung solcher Experimente können im Moment keine allgemein gültigen Empfehlungen abgegeben werden. Der Zeitpunkt der Experimente sollte im Moment fallweise festgelegt werden. Die Grundlagenforschung auf dem Gebiet des Arzneimitteltransports ist im Moment stark gefordert, für Aufnahmesysteme die exakten Transportmechanismen aufzuklären. Bei den Exportsystemen besteht die Herausforderung im

Moment darin, bessere prädiktive Modelle (sowohl Tiermodelle wie neue Zellsysteme) zu entwickeln.